

Bases científicas de la regeneración cardiaca

Ana Sánchez García.

Unidad de Medicina Regenerativa.

Instituto de Biología y Genética Molecular

Universidad de Valladolid/CSIC

A pesar de muchos retrocesos y decepciones, naturales durante el establecimiento de cualquier terapia nueva, la cardiología regenerativa ofrece un enorme potencial terapéutico. Las células de la médula ósea (CMO) y las células madre mesenquimales (CMM) han sido, por ahora, las más utilizadas en los ensayos clínicos. Las primeras tienen la ventaja de su altamente comprobada seguridad, pero los datos recientes sugieren que las CMM podrían tener mayor plasticidad. Las células del estroma de la médula ósea están en la intersección entre estas dos categorías. Los ensayos clínicos con CMO han mostrado resultados terapéuticos relativamente modestos y sería conveniente revisar protocolos y diseños para aumentar la eficacia. Es esencial obtener más información acerca de los mecanismos para llevar a cabo modificaciones racionales del diseño, y esto requiere aumentar la investigación básica asociada a los ensayos clínicos. La experimentación en animales grandes, más próximos al modelo humano, sería de gran ayuda para refinar los protocolos. Por otro lado, los modelos “*in vitro*” son muy útiles para probar rápida y simultáneamente un gran número de modificaciones sistemáticas. Las células madre residentes cardiacas (CMRC) han despertado grandes expectativas y la puesta a punto de fármacos capaces de activar, movilizar y estimular las CMRC para generar cardiomiocitos *in situ*, así como la expansión de la CMRC *in vitro* son dos objetivos claros. Algunas poblaciones de progenitores cardiacos podrían también rellenarse con CMO circulantes. Las células madre embrionarias (CME) necesitarán más tiempo para entrar en la terapéutica, pero la investigación con CME es igualmente importante y debe servir de fuente de inspiración para la medicina regenerativa. La producción de células pluripotentes inducidas (iPSC) abre una vía completamente nueva, que acerca las células madre adultas y embrionarias. La investigación con distintos tipos de células madre no es antitética, sino complementaria.

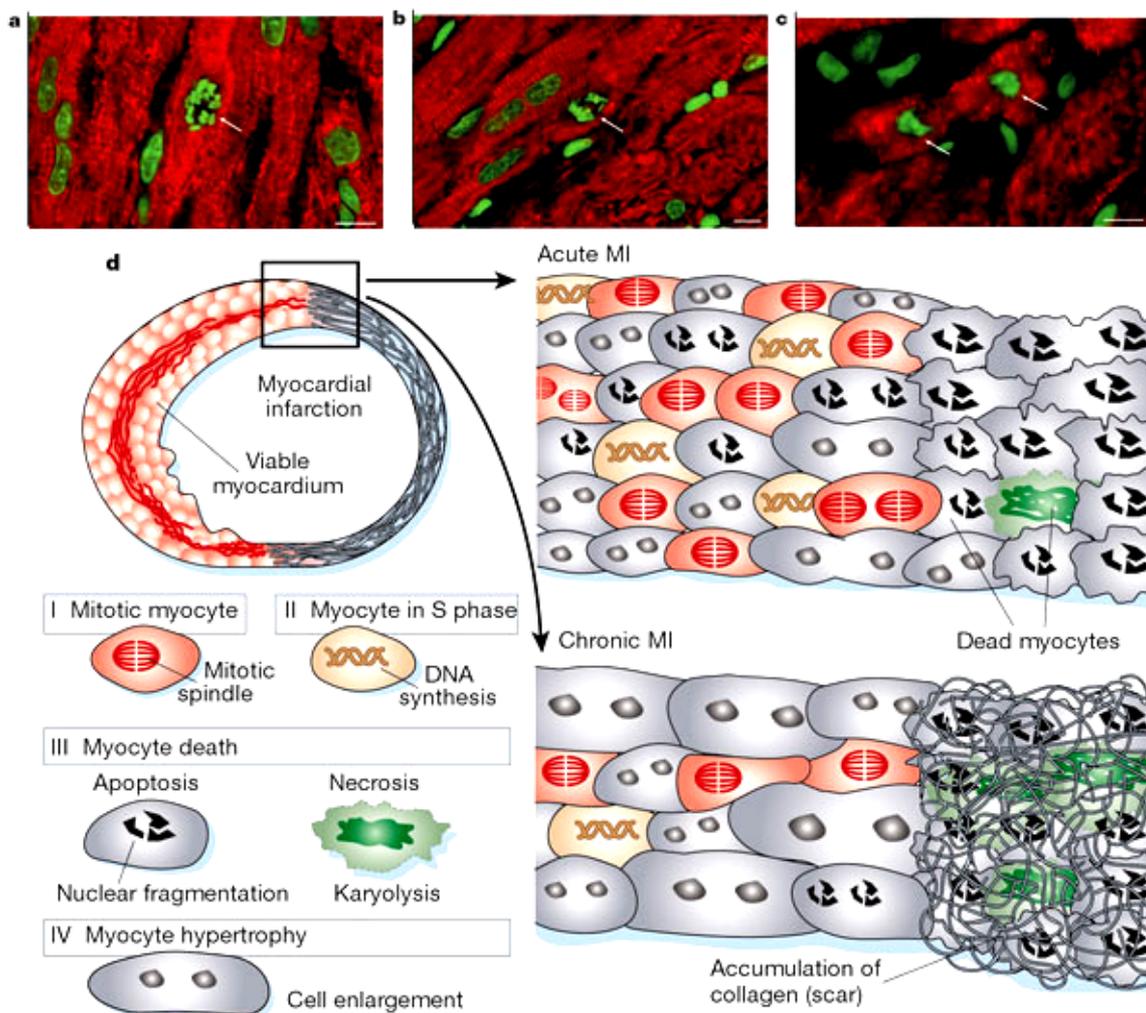
¿Es inmortal nuestro corazón?

Es muy importante que reconozcamos la capacidad regenerativa del corazón pues, de lo contrario, tras una lesión destructiva del tejido cardiaco nuestros esfuerzos se limitarían a intentar preservar lo que sobrevivió después de un accidente isquémico, sin tan siquiera pensar en otras posibilidades terapéuticas. Sabemos hoy que en el ratón, el número de células que entran en el ciclo mitótico cada día, medidas con bromodeoxiuridina, es el mismo que el de las células que entran en apoptosis: entre el 0,25 y el 1 % de la población total de cardiomiocitos. Esto representa una renovación total del tejido cardiaco del ratón en menos de un

año . En el caso del corazón humano, con cifras de recambio en torno al 0.06%, la renovación total ocurriría en 4-5 años . Otras estimaciones del recambio cardiaco, oscilan entre 0.0005 y 3% .

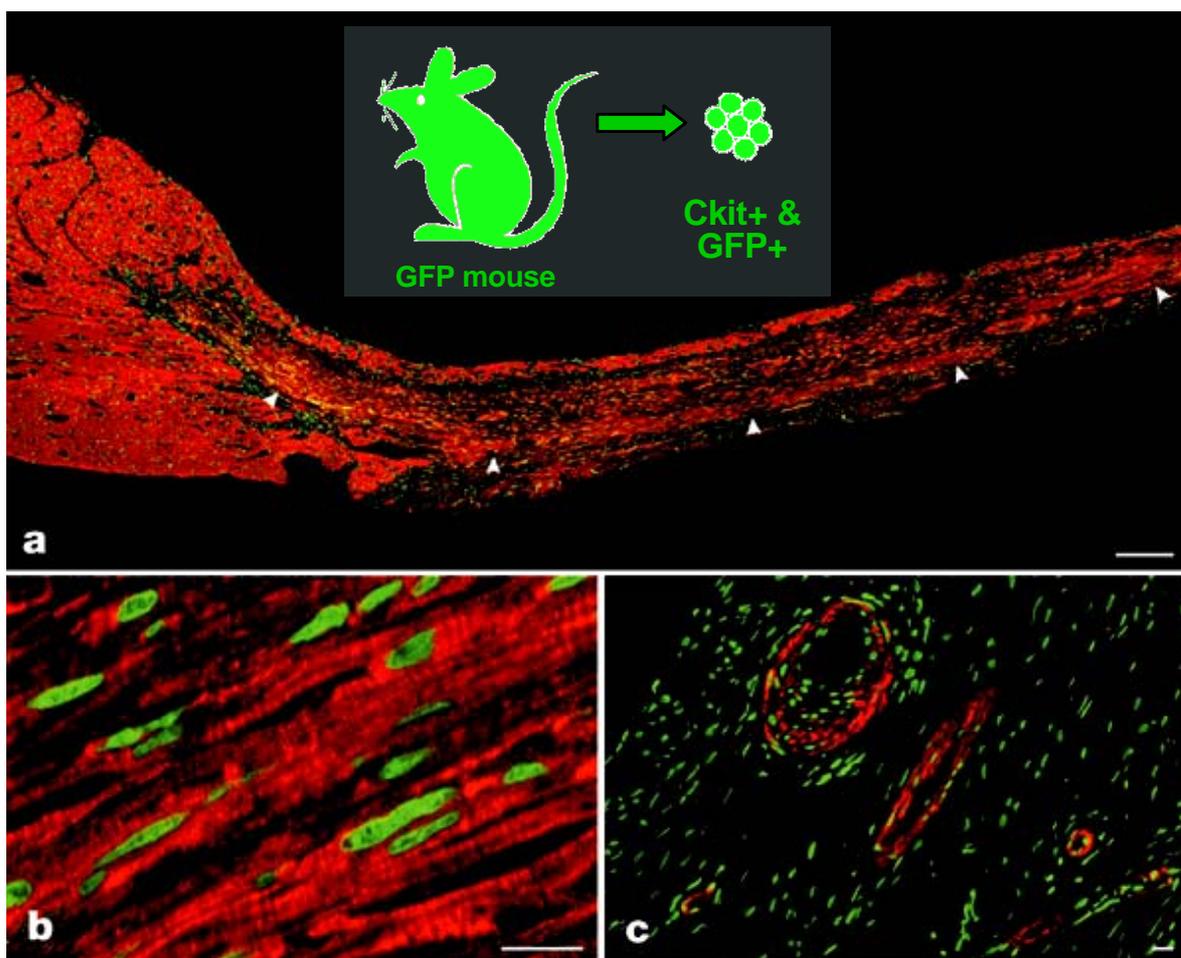
En cualquier caso estudiando el parénquima cardiaco del ratón a lo largo de la vida adulta, se pueden constatar imágenes de mitosis en varias fases, como puede verse en la figura 1, parte superior.

Sin embargo, es bien conocido que después de un infarto agudo de miocardio (IAM) el parénquima cardiaco no regenera espontáneamente. Durante el denominado *remodelado cardiaco* la lesión es substituida por una cicatriz de tejido fibroso, sugiriendo que el potencial de las células madre residentes cardiacas (CMRC) no es suficiente para una reposición significativa del tejido lesionado, como puede verse en la Figura.



Reparación cardíaca por células de la médula ósea

El interés en la regeneración cardíaca y su aplicación clínica arrancó en 2001 cuando Orlic y colaboradores demostraron que células Lin-negativas y *ckit*-positivas procedentes de médula ósea (MO), eran capaces de reparar infartos agudos de miocardio en ratón, reponiendo “de novo” tanto el músculo como los vasos, y logrando una notable recuperación morfológica y funcional en solo 10 días.



La novedosa hipótesis en la que se sustentaban tales hallazgos era la generación de cardiomiocitos, endotelio y músculo liso a partir de progenitores de MO. La plasticidad de células madre adultas está en un momento de intenso debate, que a veces supera el terreno científico, por lo que el lector interesado debe examinar revisiones recientes en este campo. Es bien conocido que infartos de miocardio agudos de gran extensión, conducen casi indefectiblemente a la insuficiencia cardíaca en cinco años. Por otra parte, la eficacia y seguridad de las células progenitoras de médula ósea ya ha sido extensamente probada en el tratamiento de enfermedades hematológicas en los últimos 50 años. No es de extrañar por tanto que los intentos tratar el IAM en los pacientes con células progenitoras de

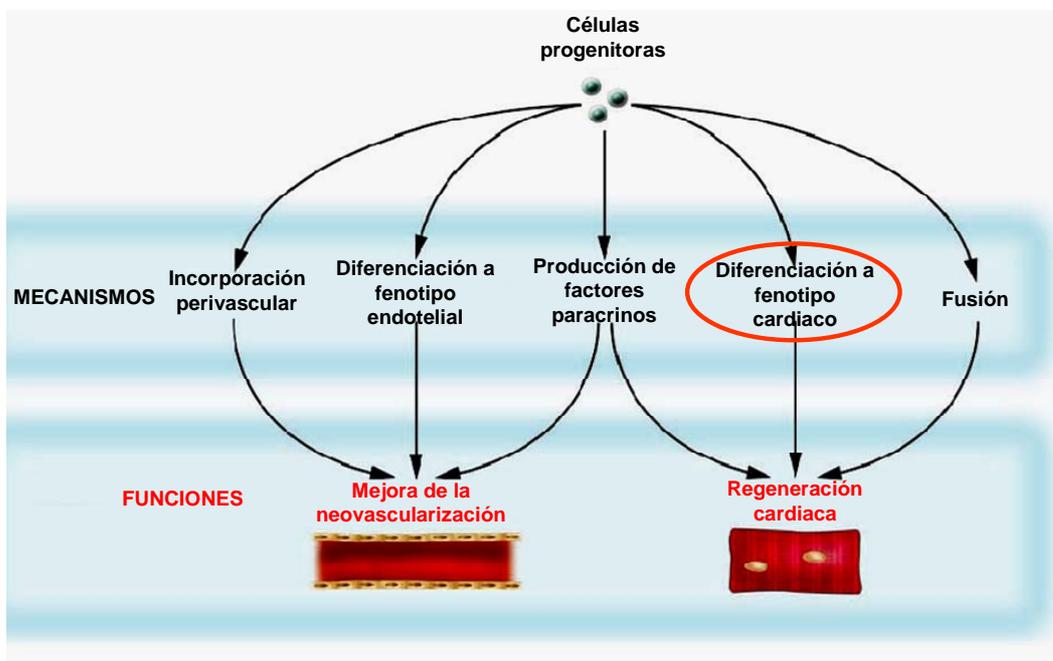
médula ósea no se hiciesen esperar. Los resultados del primer ensayo clínico fueron publicados un año después del artículo de Orlic , y en la actualidad han sido ya tratados más de 1000 pacientes. Los resultados obtenidos en varios ensayos y metaanálisis se resumen en la Tabla 1

TABLA 1. Ensayos clínicos de regeneración cardiaca.

ESTUDIO	Diseño	Num. Cels.	Num. Patients (Seguimiento)	FE	Otros Resultados
Strauer y col., 2002	CMO (F)	1-3x10 ⁷	10 (3 meses)	NS	Disminución tamaño infarto Mejora volumen/contracción, volumen sistólico final, contractilidad y movilidad de la pared
TOPCARE-AMI, Assmus y col., 2002	CMO (F) CircPg	2.5x10 ⁸ 8x10 ⁷	9 and 11 (4 meses)	+8%	Mejora viabilidad miocárdica, volumen sistólico final y movilidad de la pared. Resultados similares al año en (30+29 pacientes) (Schachinger y col, 2004)
TECAM, Fernandez - Aviles y col., 2004	CMO (F)	8*10 ⁷	20 (6 meses)	+6%	Mejora volumen sistólico final y función regional. Aumento del grosor de la pared infartada
BOOST, Wollert y col., 2004 (14); Meyer y col., 2006	CMO (T) Aleatorizado	2.5x10 ⁹	30 (6 meses) 30 (18 meses)	+6% NS	Recuperación más rápida con CMO?
Janssens y col., 2006	CMO (F) Aleatorizado, doble ciego	3x10 ⁸	33(3 meses)	NS	Disminución tamaño infarto Mejora de función regional
ASTAMI, Lunde y col., 2006)	BMC (F) Aleatorizado	7*10 ⁷	47 (6 meses)	NS	No diferencias en el tamaño del infarto
REPAIR-AMI, Schachinger y col., 2006)	BMC (F) Aleatorizado, doble ciego	2.4*10 ⁸	101 (4 meses)	5.5%	El placebo aumento la FE 3% Mejores resultados en pacientes con mayor caída de la FE Reducción de eventos clínicos adversos a los 12 meses

Como puede verse la factibilidad y seguridad de los ensayos esta demostrada, pero la eficacia es modesta. Por ejemplo, en la fracción de eyección algunos autores muestran una mejora del 5-6%, mientras que otros no ven mejoría alguna. La misma ligera mejoría se puede aplicar a otros parámetros estudiados. Parece claro, por tanto, que existen diferencias con los magníficos resultados previamente obtenidos en roedores. Este punto debería ser tomado en consideración antes de iniciar nuevos ensayos.

Por otra parte, las diferencias en el diseño, la selección, el origen celular, dosis, vía y momento de aplicación hacen que los resultados sean difíciles de comparar. Pero el principal problema es que no tenemos una idea clara de la interpretación a nivel celular de los resultados obtenidos, ya que solamente en algunos casos se han llevado a cabo ensayos celulares básicos en paralelo. Los resultados iniciales fueron interpretados en términos de transdiferenciación de las células de la MO a cardiomiocitos y capilares, como en el ratón. Sin embargo, otras hipótesis como la angiogénica y la paracrina han cobrado gran fuerza en la actualidad. En el primer caso, los precursores de células endoteliales producirían capilares que ayudarían a preservar más cardiomiocitos en la zona de penumbra. En el segundo, las células infundidas producirían factores tróficos que evitarían la muerte celular y/o estimularían la proliferación de las de células madre residentes como se muestra en la Figura.

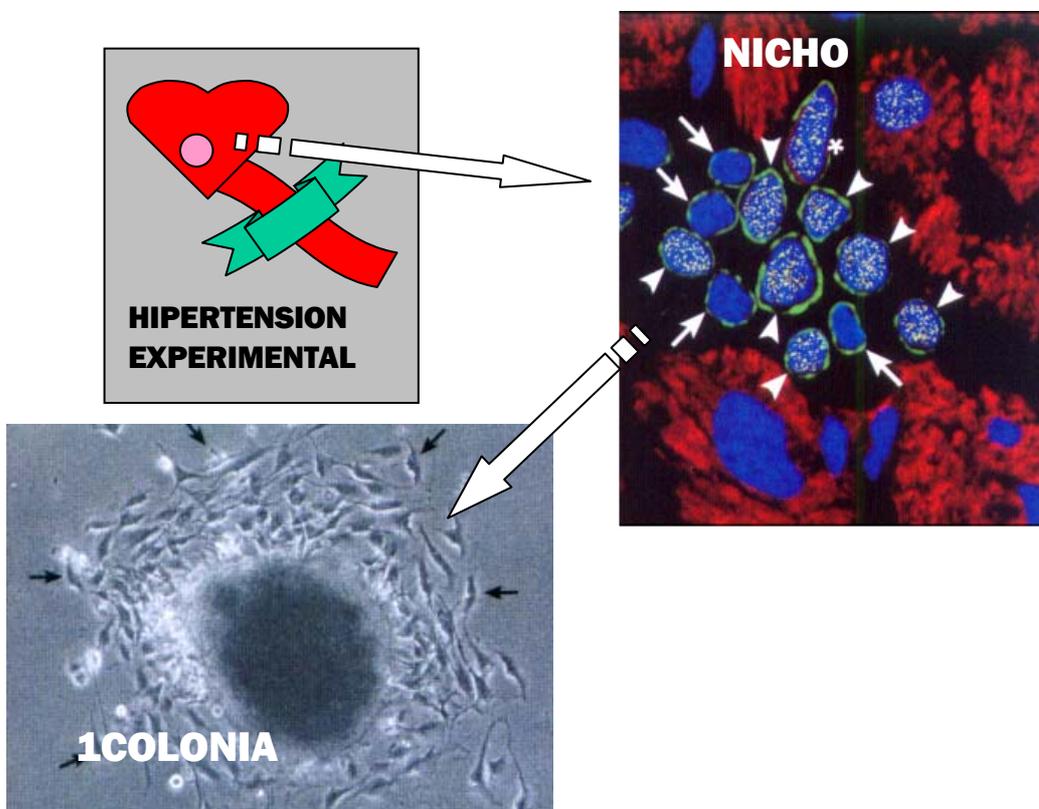


Células Madre Residentes

Otra frontera en el campo de la regeneración cardíaca ha sido la identificación de células madre *residentes* cardíacas (CMRC). La caracterización y clonación de las CMRC en el corazón adulto son muy recientes.

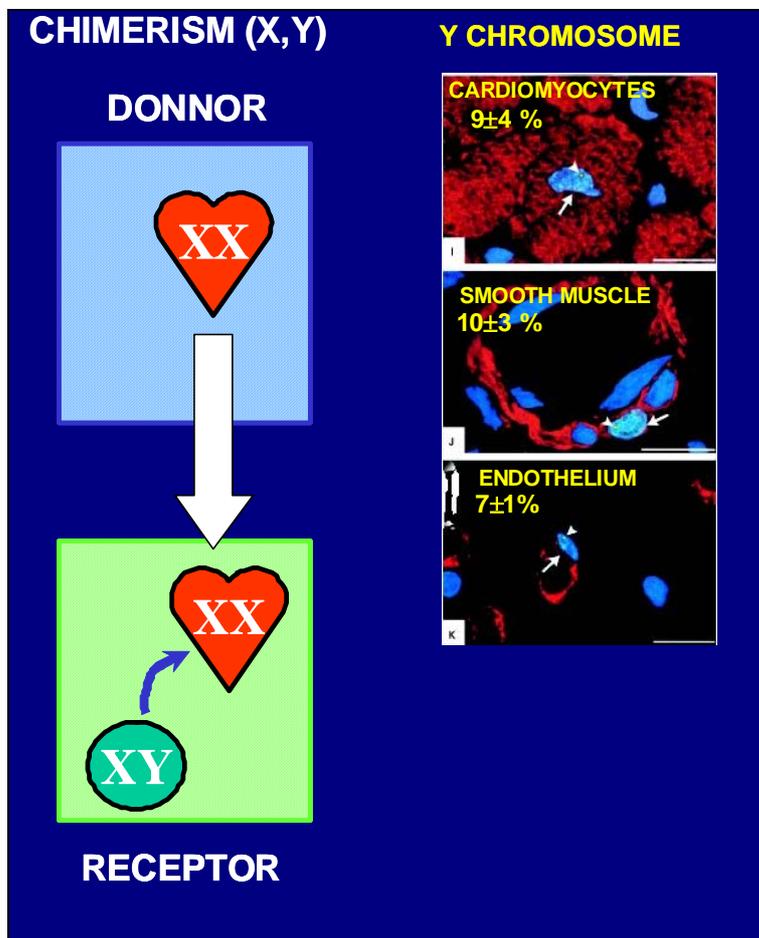
Las CMRC se encuentran en nichos específicos diseminados en el espesor de la pared cardíaca. En muchos casos expresan varios marcadores de células madre, como el c-Kit. (El receptor del factor de crecimiento de células madre o SCF, de *Stem Cell Factor*), el antígeno 1 de célula madre (Sca-1) o la glicoproteína P (también llamada MDR-1, de *Multi-Drug Resistance*), o incluso todos ellos. Las CMRC pueden realizar división asimétrica, lo que asegura la auto-renovación. Son células multipotenciales, capaces de originar progenitores cardíacos (PgC) comprometidos a cada uno de los linajes cardíacos, cardiomiocitos, células del músculo liso y células endoteliales

Los progenitores cardíacos tienen la capacidad de proliferar y convertirse en precursores (PrC) y, finalmente, en células diferenciadas. Se cree que el factor que define la tasa de expansión para las CMRC de ratón ronda el 1000x. La cantidad de cardiomiocitos nuevos producidos diariamente en el corazón humano ha sido cuantificada en aproximadamente 5×10^6 , pero podría verse incrementado unas 100 veces tras un IAM. Este incremento se debe por un lado al crecimiento en el número de CMRC y a un aumento en la frecuencia del ciclo celular. Las CMRC también aumentan durante la hipertrofia cardíaca inducida por la estenosis aórtica, como puede verse en la Figura.



El origen de las Células Madre Residentes Cardiacas

El origen de las CMRC no está resuelto en la actualidad. Podrían representar restos de células pluripotentes del período embrionario o ser la expresión de células madre extrínsecas que colonizaron el corazón llegando a través de la sangre. Esta posibilidad fue apuntada por primera vez tras la observación de quimerismo en transplantes en los que se utilizaron células donantes del sexo opuesto. Por ejemplo, se constató en mujeres que recibieron transplantes de médula ósea donada por hombres, algunos cardiomiocitos mostraban el cromosoma Y. Paralelamente, en varones transplantados con un corazón proveniente de un donante femenino se detectó la presencia de cardiomiocitos, células del músculo liso y, más frecuentemente, las células endoteliales que portaban cromosoma Y.



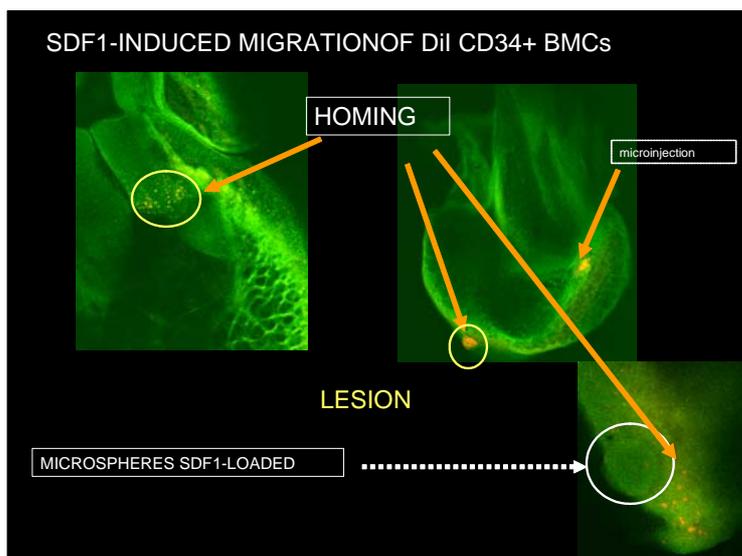
Estos resultados sugieren que las CMO pueden anidar en el corazón y producir CMRC, PgC, PrC o células diferenciadas. Por tanto el origen de las nuevas células cardíacas podría ser doble, intrínseco o extrínseco. El proceso por el cual se produce la transformación de CMO a células cardíacas podría ser transdiferenciación o dediferenciación de una célula madre comprometida o diferenciación de una célula madre pluripotencial proveniente de la médula ósea.

En cualquier caso, se ha demostrado recientemente que algunas CMO son clonogénicas y tienen la capacidad de auto renovarse y de llevar a cabo una diferenciación hacia tres linajes cardiomiocitos, células del músculo liso y endoteliales

Por otro lado, algunos estudios independientes sobre clonación han demostrado que las células estromales adultas de médula pueden dar origen a las llamadas células cardiomiogénicas (CMG) que se diferencian a cardiomiocitos. Entre las células de MO, las células estromales, generalmente llamadas células mesenquimales tienen una mayor plasticidad para producir células diferenciadas que otros tipos celulares provenientes de médula ósea. Las células madre mesenquimales (CMM) se pueden obtener de otros tejidos además de la médula ósea y pueden ser expandidas en un laboratorio de calidad Farmacéutica para uso clínico.

¿Cual es la llamada para las células madre?

Debe existir algún mensajero que haga a las células residentes dividirse o que promueva el anidamiento de las circulantes hacia el tejido lesionado. En el corazón de ratón las células de médula ósea inyectadas se acumulan selectivamente en el área lesionada. En el corazón de pollo en desarrollo las CMO inyectadas también se dirigen a la lesión., como puede verse en la Figura.



El mensajero debería ser similar en todos los tejidos y ser liberado por las células dañadas. Citoquinas como el factor estimulador de colonias (G-CSF) o el factor de crecimiento de células madre (SCF de *Stem Cell Factor*), movilizan progenitores de la médula ósea, contribuyendo a la reparación cardíaca. El factor estimulador de colonias G-CSF también estimula la migración y diferenciación a cardiomiocitos de células cardiomiogénicas derivadas de células estromales. Los extractos de células embrionarias, ricos en factores de crecimiento, podrían ser también medios condicionados adecuados, ya que en presencia de células embrionarias, las células madres adultas ven favorecida su plasticidad

Conclusiones.

A pesar de muchos retrocesos y decepciones, que son naturales durante el establecimiento de una nueva terapia, la cardiología regenerativa ofrece un enorme potencial terapéutico. Las CMO y las CMM han sido las más frecuentemente utilizadas en los ensayos clínicos en humanos. Las CMO tienen a su favor la experiencia previa de 50 años de uso terapéutico para las enfermedades hematológicas, que han probado exhaustivamente su bioseguridad. Las CMM parecen tener un mayor potencial plástico, pero su bioseguridad a largo plazo no ha sido probada en detalle. Las células estromales de médula ósea están en la intersección de los dos tipos celulares escritos. Los resultados de los ensayos clínicos han sido relativamente modestos. Es tiempo quizá de revisar los protocolos y diseños para mejorar los resultados. El conocimiento de los mecanismos de acción sería muy útil guiar modificaciones racionales del diseño terapéutico, y esto requeriría aumentar el componente de investigación básica asociada a los ensayos clínicos. La experimentación animal en modelos más próximos al ser humano serían muy útiles para refinar los protocolos clínicos. Por otro lado, el uso de modelos *in vitro* es muy útil, ya que permite probar rápidamente modificaciones sistemáticas de diferentes variables y posibles mejoras. La combinación de la información obtenida en diferentes modelos, *in vitro*, animales y humanos, facilitará la traslación a la clínica. Las células madre residentes del corazón, descubiertas recientemente, abren nuevas esperanzas y expectativas. Los fármacos capaces de *despertar* las células madre residentes y de movilizarlas para formar tejido contráctil *in situ* o la expansión celular *in Vitro* seguida de la inyección en el área dañada son dos de los objetivos más obvios. Debe recordarse que algunas poblaciones de progenitores cardiacos, como la de células colaterales (SPC) o las células cardiomiogénicas (CMG) pueden rellenarse a partir de células circulantes procedentes de la médula ósea . Las células embrionarias) humanas requerirán más tiempo para entrar en el arsenal terapéutico, pero esto no quiere decir que sean menos interesantes como objeto de investigación. Por el contrario, el estudio de la proliferación y diferenciación de las CME debe ser la fuente de inspiración la Medicina Regenerativa. La producción de células pluripotentes inducidas (iPSC) abre una vía completamente nueva, que acerca las células madre adultas y embrionarias. La investigación con distintos tipos de células madre no es antitética, sino complementaria.